

Aus der I. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Klaus Holldack)

DIE WIRKUNG VON BUSULFAN AUF DIE PROLIFERATION VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Süßenbach

geb. in Rijswijk/Holland

1976

aus der Medizinischen Abteilung
des Kaiserlichen Krankenhauses für Frauen und Kinder
in Berlin (Vortrag am 1. April 1906)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Klaus Holldack)

DIE WIRKUNG VON BUSULFAN AUF DIE PROLIFERATION VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johannes Süßenbach

geb. in Rijswijk/Holland

Referent: Professor Dr. I. Boll

Korreferent: Professor Dr. H. Brücher



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18. 3. 1976

I N H A L T

	Seite
Literaturüberblick	4
Fragestellung	9
Material und Methode	10
Ergebnisse	15
Zusammenfassung der Ergebnisse	58
Diskussion	60
Zusammenfassung	63
Literaturverzeichnis	64

Literaturüberblick

Haddow und Timmis ²⁶ erhielten 1951 durch Substitution des reaktiven Chloratoms im N-Lost durch eine Mesylgruppe $O - SO_2 - CH_3$ Verbindungen mit cytostatischer Wirkung, und fanden 1953 ²⁷ im 1,4-Dimethylsulfonylbutan = Busulfan ein Sulfonat mit deutlich tumorhemmendem Effekt. Die klinische Erprobung erbrachte durch Galton ¹⁹ und Haddow ²⁵ 1953 eine depressive Wirkung auf die Granulopoese. Seitdem wurde in vielen Tierexperimenten die Einwirkung des Busulfan auf das periphere Blut beobachtet. In den Jahren 1953 bis 1955 zeigten Untersuchungen von Bollag ⁶, Elson ^{16,17} und Glombitza, Loeser ²³ eine überwiegend starke Verminderung der Granulozyten, die nach 12 bis 20 Stunden begann und nach 12 Tagen das Minimum erreichte. Elson ¹⁶ beschreibt ein Absinken der Erythrocyten- und Thrombocyten-Zahl bei starken Busulfan-Dosen nach etwa 8 bis 10 Tagen. Damjan Zelenika und Stojacovic ¹¹ stellten 1970 ebenfalls an Rattenversuchen fest, daß Busulfan in Überdosierung, besonders in Verbindung mit Bestrahlung, hochtoxisch auf die Erythropoese wirkt und zu schwerer hypochromer Anaemie, ständiger Hypoplasie des Knochenmarks und hoher Mortalität führt, daß bei anschließend niedriger Dosierung aber die Erythropoese relativ schnell wieder regeneriert. Gerhartz ²¹ beschreibt 1958 bei normaler Dosierung keine wesentliche Erythrocytenverminderung, dazu eine flüchtige Lymphopenie und eine vorübergehende reaktive Zunahme der Thrombocyten bis zum 9. Tag, die dann in eine deutliche Verminderung übergeht. Dagegen fallen die Untersuchungen von Aust und Boll (1972) ¹ über die Veränderung der Thrombocytenzahl bei chronischen Myelosen unter Busulfantherapie auf, die von 24 Patienten bei 17 einen Anstieg, bei nur 2 eine Abnahme der Thrombocyten und bei 5 keine Veränderung nachwiesen, und zwar sowohl unter der Dauer- als auch unter der Intervallbehandlung mit Busulfan. Dieser Effekt auf die Thrombocytenzahlen, der auch bei anderen Behandlungen auftrat, wird von Aust und Boll nicht speziell auf das Busulfan zurückgeführt, vielmehr könnte er an die Remission

der chronisch myeloischen Leukämie gebunden sein. In vitro-Versuche von Patrono und Mitarbeiter ⁴⁴ (1968) zeigten keinen Einfluß von Busulfan auf die Zellreifung menschlicher Lymphocyten.

Zytostatische Substanzen überqueren ebenso wie gelegentliche die leukämischen Zellen des mütterlichen Kreislaufs die Placentarschranke beim Menschen (Hoover und Schumacher, 1966) ²⁹ wie auch im Tierversuch (Bollag 1954 ⁷, Murphy und Mitarbeiter 1957 ⁴¹). Bei unterschiedlichen Wirkungsmechanismen üben sie ihren Haupteffekt auf rasch proliferierende Gewebe aus, so daß, wie Versuche an Ratten zeigten, eine besondere Beeinflussung der fetalen Entwicklung zu erwarten ist. Nach Burkl, Kellner ⁹ und Kenis und Mitarbeitern ³³ (1955) bedingte das Ratten injizierte Busulfan als typisches Proliferationsgift bereits bei geringer Dosierung eine Atropie von Hoden und Ovarien ²³, Hemmung der Spermatogenese ³³ und eine Verminderung der Anzahl der ins Wachstum tretenden Eizellen. ⁹ Wurde trächtigen Ratten Busulfan injiziert, so blieben die männlichen und weiblichen Nachkommen steril, die Histologie ihrer Hoden und Ovarien zeigte ein völliges Fehlen germinativer Elemente (Bollag 1954 ⁷); Murphy und Mitarbeiter (1957) ⁴¹ beobachteten an diesen Nachkommen Minderwuchs, Gaumenspalten und Abnormitäten der Extremitäten. Die Ergebnisse von Tierversuchen sind jedoch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, da auch zwischen einzelnen Spezies erhebliche zeit- und dosisabhängige Varianten der Empfindlichkeit bestehen (Uhl und Mitarbeiter 1968) ⁵⁶. Die Zahl der Berichte über die Wirkung von Busulfan auf menschliche Feten ist gering: Dugdale und Fort ¹⁵ berichteten 1967 über eine eigene Beobachtung und weitere neun Fälle aus der Literatur, je einen weiteren Fall erwähnten Braun, Rummel ⁸ 1965 und Uhl und Mitarbeiter ⁵⁶ 1968. Jedesmal lag eine behandlungsbedürftige chronisch myeloische Leukämie der Mutter vor, wobei alle zwölf Neugeborenen äußerlich normal waren. Bei acht Kindern, von denen Blutbilder angefertigt wurden, lagen die Leukozytenzahlen im Normbereich. Uhl und Mitarbeiter zeigten an der

durchgeführten Chromosomenuntersuchung unauffällige Befunde der Struktur und Anzahl der kindlichen Chromosomen, während die mütterlichen Brüche und Achromasien aufwiesen.

Busulfan besitzt eine überlegene Wirkung bei der chronisch myeloischen Leukämie und wird gelegentlich auch bei der Polycythaemia vera angewandt (Killmann und Cronkite 1961³⁴). Gollerki und Shah²⁴ beobachteten 1963-1967 113 Fälle mit chronisch myeloischer Leukämie unter Busulfantherapie und beschrieben eine mittlere Überlebenszeit von 21 Monaten sowie bei 40 verstorbenen Patienten mittlere Remissionen von 41,2 Monaten. Die längste Remission, die in der Literatur beschrieben wurde, beläuft sich auf sieben Jahre (Djaladetti 1966¹³); die mittlere Überlebenszeit wird mit drei bis dreieinhalb Jahren angegeben (Aust und Boll 1972¹, Gerhartz und Mitarbeiter 1962²², Stacher 1966⁵⁴).

Die Durchschnittsdosis beträgt 0,06 mg/kg Körpergewicht täglich per os in einmaliger Gabe, die dosis letalis wird von Gerhartz²¹ 1958 mit 122mg/kg angegeben. Busulfan wird auch zur Dauertherapie verschrieben (Moeschlin 1966³⁹, Obrecht 1968⁴²). Ionescu³² (1971) und Stacher⁵⁴ (1966) hingegen empfehlen eine Intervallbehandlung, um Nebenwirkungen zu vermeiden.

Als Nebenwirkungen werden häufig Amenorrhoe (Ionescu 1971³², Kenis und Mitarbeiter 1955³³, Obrecht 1968⁴²), Hemmung der Spermatogenese (Ionescu 1971³², Kenis und Mitarbeiter 1955³³) und Chromosomenaberrationen (Fukushima und Zeldis 1970¹⁸, Patrono und Mitarbeiter 1968⁴⁴, Richmond und Kaufmann 1969⁴⁷) beobachtet. Wie in vivo-Versuche von Gebhardt und Mitarbeiter²⁰ (1973) zeigen, hängt die feststellbare cytogenetische Aktivität im wesentlichen von der verabreichten Busulfandosis ab. In den rasch proliferierenden Knochenmark-Zellen wird ein Teil der Chromosomendefekte aufgrund letaler Wirkung wieder ausselektiert.

Leake und Mitarbeiter ³⁷ (1963) sowie Oliner und Mitarbeiter ⁴³ (1961) stellten nach Busulfantherapie einige interstitielle Lungenfibrosen fest. Dosic und Mitarbeiter ¹⁴ (1970), Hayhoe und Kok ²⁸ (1957), Ionescu ³² (1971) und Storli und Pederzini ⁵⁵ (1955) beschreiben einzelne Fälle, bei denen es unter Busulfantherapie zu teilweise irreversiblen Markaplasien gekommen ist. Die in seltenen Fällen auftretende Knochenmarksfibrosierung (Hunstein und Mitarbeiter 1965 ³⁰, Obrecht 1968 ⁴²) stellt laut Hunstein eine nach Busulfanbehandlung auftretende exogen ausgelöste Begleitfibrose dar. Eine spezifisch fibrosierende Wirkung des Busulfan wurde von Hunstein 1965 ³¹ durch Langzeitversuche an Ratten widerlegt. Weiterhin beschreiben Dosic und Mitarbeiter ¹⁴ 1970 als Folge der Therapie mit hohen Dosen Busulfan einen bullösen Hautausschlag ähnlich dem Erythema multiforme sowie eine Erhöhung der alkalischen Leukozytenphosphatase; Kyle und Mitarbeiter ³⁶ (1961) sowie Marchal und Mitarbeiter ³⁸ (1962) weisen auf addisonähnliche Syndrome mit Hautpigmentierungen hin. Durch Schmähel und Oswald ⁵² wurde 1970 eine karzinogene Wirkung mit Rattenversuchen nachgewiesen; seitdem haben sich die Befunde gehäuft, die die Annahme einer engen Beziehung zwischen dem Auftreten sekundärer Chromosomenaberrationen und maligner Entartung erlauben ²⁰. Nach Knolle und Meyer ³⁵ (1969) sowie Scherf und Mitarbeiter ⁵¹ (1970) werden die Immunglobulinspiegel in therapeutischen Dosen von Busulfan nicht oder nur unwesentlich beeinflusst.

Haddow ²⁵ vermutete schon 1953, daß der Wirkungsmechanismus des Busulfan in der chemischen Alkylierung der Proteine oder Nukleoproteine in der Zelle liegt, und weiter, daß sich diese Eigenschaft vorwiegend gegen Zellen in einem aktiven Teilungsstadium richtet. Die häufig aufgestellte These, daß Busulfan in die DNS- oder RNS-Synthese eingreift (Chèvremont und Baeckeland ¹⁰ 1959), konnte nicht bestätigt werden; so wiesen Davidson und Freeman ¹² 1955 an Mäusen keinen direkten Einfluß des Busulfan in cytostatisch wirksamen Dosen bzw. Konzentrationen auf die Nucleinsäuresynthese nach. In vitro-

Versuchen von Roberts und Warwick ⁴⁹ bewiesen 1961 Reaktionen von Busulfan mit Glutathion (bei pH 8-9) und L-Cystein; weitere Ergebnisse an Rattenversuchen zeigten, daß die vorherrschende Reaktion des Busulfan in der Alkylierung einer Thiolgruppe liegt und zur Bildung von Sulfoniumionen führt (Roberts und Warwick ⁴⁸ 1959). Die in einigen Fällen beschriebenen Busulfanpigmentationen (siehe oben) erklärte Schmidt ⁵³ 1971 mit der Reaktion mit Glutathion, das auf diese Weise für die Kupferbildung ausfällt. Das ungebundene Kupfer vermag die Tyrosinase zu aktivieren, so daß Tyrosin zu Melanin oxydiert und auf diese Weise die Pigmentation hervorgerufen wird. Dagegen zogen Roberts und Warwick ⁵⁰ 1961 aus Untersuchungen über den Stoffwechsel des Busulfan den Schluß, daß die wesentliche Reaktion mit Cystein oder einer Cysteinylhälfte vorliegt, und daß ein cyclisches Sulfoniumion gebildet wird, welches einem Zerfall in Tetrahydrothiophene unterliegt. Dies wird wiederum in Tetrahydrothiophen 1,1 - Dioxyd und von da in 3 - Hydroxytetrahydrothiophene - 1,1 -Dioxyde umgewandelt.

Van Putten und Idsenka ⁴⁶ berichteten 1971, daß Busulfan auf die rasch proliferierende Stammzelle stärker wirkt als auf die ruhende. Da sich die wachsende Zelle von der ruhenden durch die gesteigerte Proteinsynthese unterscheidet, kann angenommen werden, daß Busulfan in der Proteinsynthese angreift. Dagegen beobachtete Basleer ² 1965 eine andere Reaktion an Fibroblasten in vitro: Unter Busulfaneinfluß trat eine Vermehrung der DNS sowie der Nukleoproteine ein, die, sobald sie sich verdoppelt hatten, die Zelle an einem Eintritt in die Mitose hemmten.

Ob der Wirkungsmechanismus des Busulfan, der zur Depression der Granulopoese führt, in der Proteinsynthese angreift oder im Einfluß auf die DNS und Nukleoproteine zu suchen ist, konnte noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Fragestellung

Diese Arbeit befaßt sich mit der Aufzeichnung von Veränderungen der Erythropoese und Granulopoese an Knochenmarkkulturen nach Behandlung mit Busulfan - in je zwei verschiedenen Konzentrationen - im Vergleich zu unbehandelten Kulturen desselben Patienten. Dazu werden folgende Fragen gestellt:

1. Wie ist die Reifung in vitro nach Differentialzählung verändert?
2. Wie verhalten sich Granulopoese und Erythropoese zueinander, das heißt: wird eine der beiden Reihen stärker beeinflußt als die andere?
3. Wie verhält sich die Proliferation der Granulopoese und der Erythropoese während drei Tagen in den behandelten Kulturen, verglichen mit den unbehandelten?
4. Kommt es zu einer Veränderung der Mitosetätigkeit durch den Einfluß von Busulfan?

Material und Methode

Bei routinemäßiger Sternalpunktion verschiedener Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wurde das Knochenmark gewonnen und nach der Carrel'schen Deckglaskulturmethode, modifiziert nach Boll ⁴, kultiviert:

Das zur Koagulation gebrachte Medium bestand aus:

50% Nativplasma des betreffenden Patienten

30% Serum, dreifach verstärkt

10% Corhormon, dreifach verstärkt

10% Aceton bzw. Busulfan in 10% Aceton gelöst.

Nach Aufsetzen eines Knochenmarkbröckels auf das Koagulum im Hohlsliffobjektträger und Bedeckung mit Eigenserum wurde ein Hartparaffinverschluß und Inkubierung bei 37°C im Brutschrank vorgenommen. Die Konzentration des beigemengten Zytostatikums betrug bei der Kultur 1 50 µg/ml, bei den Kulturen 1, 2 und 3 jeweils je 25 µg/ml und 50 µg/ml, und entsprach damit der bei Patrono ⁴⁴ angegebenen und als optimal eruierten Konzentration. Neben den Cytostatika-Kulturen wurden Kontrollkulturen bebrütet, denen an Stelle des Busulfan Acetonlösung beigegeben war, da Busulfan ohne diesen Lösungsvermittler nicht löslich war.

Ausstriche wurden sofort nach Sternalpunktion, und von den cytostatisch behandelten und den Kontroll-Kulturen nach 24, 48 und 72 Stunden angefertigt, an der Luft getrocknet und mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung nach Pappenheim gefärbt ³⁹. Es folgte die mäanderförmige Auswertung der Präparate und Zählung der Zellen, wobei aus jedem Präparat mindestens 2000 Zellen ausgezählt wurden.

Die Bestimmung der Zellen erfolgte nach den von Boll ⁴ sowie Boll und Mersch ⁵ angegebenen Kriterien:

Die rote Reihe wurde differenziert in:

1. Proerythroblast

2. basophiler Erythroblast
3. polychromatischer Erythroblast
4. oxyphiler Erythroblast
5. reifer Erythroblast

Als teilungsfähig wurden die Zellen 1-4 angesehen.

Die weiße Reihe wurde differenziert in:

1. Myeloblast
2. Promyelocyt
3. neutrophiler Myelocyt
4. eosinophiler Myelocyt
5. basophiler Myelocyt
6. Metamyelocyt
7. Promonocyt o. Monoblast
8. stabkerniger Granulocyt
9. neutrophiler segmentkerniger Granulocyt
10. eosinophiler segmentkerniger Granulocyt
11. basophiler segmentkerniger Granulocyt
12. Monocyt

Als teilungsfähig wurden die Zellen 1-7 angesehen.

Weiterhin wurden gezählt:

große, kleine und phagozytierende Retikulumzellen
Plasmoblasten und Plasmazellen
Megakaryoblasten und Megakaryozyten
Lymphoblasten und Lymphozyten

Die verschiedenen Mitosephasen wurden nach Boll ⁴ folgendermaßen eingeteilt:

1. Prophase: Auflösung der Kernmembran, Lockerung der Kernsubstanz. Die Nukleolen verschwinden, die Chromosomen sind in einem festen Spirem geordnet.

2. Frühe Metaphase: Bildung eines lockeren Spirems, Verteilung der Chromosomen über die ganze Zelle.
3. Späte Metaphase: Es findet eine Chromosomenverdoppelung statt, Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene, Bildung des Monasters.
4. Anaphase: Diasterbildung, Auseinanderweichen der Chromosomen zu den Spindelpolen hin.
5. Telophase: Einschnürung des Cytoplasmas, die Chromosomen bilden jetzt ein lockeres Dispirem.
6. Rekonstruktionsphase: Bildung eines festen Dispirems an zwei Zellen, die fadenförmig verbunden sind, Kernausbildung und Membranbildung.

Zur Auswertung des Zellmaterials wurde folgendes herangezogen:

1. Reifungskurven:

veranschaulichen die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellarten von Erythropoese und Granulopoese nach den jeweiligen Bebrütungszeiten von 24, 48 und 72 Stunden.

2. roter Mitoseindex (rMI):

angegeben in %, ergibt sich aus dem Quotienten der sich teilenden durch die teilungsfähigen Zellen der Erythropoese. Er ist somit ein Maß für die Teilungshäufigkeit der roten Zellen.

weißer Mitoseindex (wMI):

angegeben in %, ergibt sich aus dem Quotienten der sich teilenden durch die teilungsfähigen Zellen der Granulopoese. Er ist somit ein Maß für die Teilungshäufigkeit der weißen Zellen.

3. G/E-Index:

bestimmt durch den Quotienten aller granulopoetischer Zellen durch die Gesamtzahl aller Erythroblasten. Er zeigt Änderungen im Verhältnis von der Granulopoese zur Erythropoese an. Bei deutlicher Depression der roten Reihe steigt der G/E-Index an, bei deutlicher Depression der weißen Reihe fällt der G/E-Index ab.

4. karyologische Kurven:

zeigen die prozentuale Verteilung der einzelnen Mitosestadien der Granulopoese und der Erythropoese.

5. Signifikanzberechnung:

sie sagt aus, ob zwischen den Werten der Kontrolle und den Werten bei Zusatz mit Busulfan nach gleichlanger Inkubationszeit kein signifikanter, ein signifikanter oder ein hoch signifikanter Unterschied besteht. Die Berechnungen wurden mit dem χ^2 - Test nach Pearson ⁴⁴ durchgeführt und erfolgen nach der Formel:

$$\chi^2_{mf} = \frac{(p - q)^2}{q}$$

Darin bedeuten p = Beobachtungswerte der einzelnen Gruppen, q die entsprechenden Erwartungswerte und mf die Anzahl der Freiheitsgrade. Zur Beurteilung der Übereinstimmung unserer Beobachtungswerte mit den Erwartungswerten wurden für die χ^2 e die dazugehörigen Wahrscheinlichkeitswerte P aus Tabellen ermittelt ³. Für die Beurteilung von P gilt:

$P > 0,05$: Die Differenz zwischen beiden Reihen ist Zufallsbedingt.

$0,05 > P > 0,01$: Die Zugehörigkeit beider Meßreihen zu derselben Grundgesamtheit ist zweifelhaft, diese Werte lassen also keine ganz klare Entscheidung zu.

$0,01 > P > 0,0027$: Die Differenz zwischen beiden Meßreihen ist statistisch einigermaßen gesichert.

$P < 0,0027$: Die Differenz zwischen beiden Meßreihen ist statistisch gut gesichert.

In den folgenden Berechnungen und graphischen Darstellungen sind nachstehend aufgeführte Abkürzungen der einzelnen Zellarten benutzt worden:

PE = Proerythroblasten	Mb= Myeloblasten
bE = basophile Erythroblasten	Pr = Promyelocyten
pE = polychrom. Erythroblasten	My = Myelocyten
oE = oxyphile Erythroblasten	eMy = eosinophile Myelocyten
rE = reife Erythroblasten	bMy = basophile Myelocyten
	Mm = Metamyelocyten
	St = Stabkernige
	Se = Segmentkernige
	eSe = eosinophile Segmentker- nige
	bSe = basophile Segmentkernige
	Mz = Monocyten

————— = Kontrollkulturen

----- = Kulturen mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan

— • • — • • — = Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan

In den caryologischen Kurven sind auf der Abszisse die Zellar-
ten in % additiv aufgetragen, und zwar oben für die Erythro-
poese, unten für die Granulopoese; die Ordinate gibt die Kul-
turzeit in Stunden wieder.

Ergebnisse

Die Wirkung von Busulfan in 2 Konzentrationen auf die Proliferation der Knochenmarkszellen wurde an den Ausstrichpräparaten von Kulturen bei vier nicht leukämischen Patienten untersucht. Nach dem Sternalpunktat und der Anfertigung der Ausstrichpräparate zu den verschiedenen Kulturzeiten wurden pro Präparat 2000 Zellen, das bedeutet in drei Fällen je 20 000 Zellen, in einem 14 000 Zellen pro Patient, zusammen also etwa 74 000 Zellen, differenziert. Es wurden der Mitoseindex und der G/E-Index ermittelt, sowie die karyologischen- und Reifungskurven angefertigt und die Signifikanz berechnet.

Versuch 1 vom Knochenmark der Patientin H.W., 60 Jahre.

Diagnose: Lymphogranulomatose

Knochenmarkdiagnose: 6.8.71, Linksverschiebung der Granulopoese, gesteigerte Erythropoese mit Vorkommen von Megaloblasten.

Therapie bis zur Sternalpunktion:

Lanicor ^R	0,25mg/die
Progynova ^R	1mg/die
Ultralan ^R	100mg/die
Natulan ^R	50mg/die
Hexobion ^R	300mg/die
Cebion'f' ^R	1 Tabl./die

Peripheres Blutbild vom 3.8.71:

Erythrocyten	3,41 Mill./mm ³
Hämoglobin	10,8 g%
HbE	31,7 pg
Leukocyten	4800/mm ³
Jugendliche	4%
Stabkernige	18%
Segmentkernige	70%
Lymphocyten	4%
Monocyten	4%
Thrombocyten	167 000/mm ³
Retikulumzellen	18%
<u>BSG</u> :	51/64

Versuch 2 vom Knochenmark der Patientin F.B., 76 Jahre.

Diagnose: Peritonealcarcinose bei Adeno-Carcinom

Knochenmarkdiagnose: 6.3.72. Angeregte, linksverschobene Granulopoese wie bei Entzündungen, Vermehrung der Mono- und Promonocyten.

Therapie bis zur Sternalpunktion:

Lanicor^R 0,5mg/die

Valium^R 10mg/die

Peripheres Blutbild vom 23.2.72:

Erythrocyten 3,81 Mill/mm³

Hämoglobin 13,2 g%

HbE 34,6 pg

Leukocyten 6800/mm³

Stabkernige 2%

Segmentkernige 54%

Lymphocyten 42%

Monocyten 2%

BSG : 74/105 Elektrophorese: Im Normbereich

Versuch 3 vom Knochenmark des Patienten E.F., 73 Jahre.

Diagnose: Pleuropneumonie re, Diabetes mellitus, chronische Hepatitis.

Knochenmarkdiagnose: 6.3.72, Linksverschobene Erythropoese wie bei Eisenmangel; Vermehrung der Promonocyten.

Therapie bis Sternalpunktat:

Euglucon^R 2,5 mg/die

Valium^R 10 mg/die

Aldactone^R 100 mg/die

Binotal^R 4 g/die

Peripheres Blutbild vom 17.2.72:

Erythrocyten 4,08 Mill./mm³

Hämoglobin 12,2 g%

HbE 29,8 pg

Leukocyten 9600/mm³

Promyelocyten 1%

Jugendliche 1%

Stabkernige 5%

Segmentkernige 79%

Lymphocyten 9%

Monocyten 5%

Thrombocyten 109 000/mm³

BSG: 20/38

Versuch 4 vom Knochenmark der Patientin E.N., 80 Jahre.

Diagnose: Flüchtiger apoplektischer Insult bei Hypertonus und thrombopenischer heamorrhagischer Diathese, sideroachrestische Anämie.

Knochenmarkdiagnose: 6.3.72, Megakaryocyten vermindert; gesteigerte, reifungsgestörte Erythropoese mit Vorkommen von Megaloblasten und Ringsideroblasten.

Therapie bis zur Sternalpunktion:

Ledermycin ^R	2 Tabl./die
Hydergin ^R	3 x 15 Tropfen/die
Lanicor ^R	0,5mg/die
Kalinor ^R	2 x 1 Brausetabl./die

Peripheres Blutbild vom 8.3.72:

Erythrocyten	2,24 Mill./mm ³
Hämoglobin	6,8 g%
HbE	30,4 pg
Leukocyten	5000/mm ³
Eosinophile	3%
Stabkernige	2%
Segmentkernige	39%
Lymphocyten	53%
Monocyten	3%
Thrombocyten	7000/mm ³
Retikulumzellen	31%

BSG: 131/156

In den folgenden Abbildungen 1 - 4 werden die Reifungskurven der Granulopoese und der Erythropoese dargestellt. Die Tabellen I, II und VII - XV zeigen die dazugehörigen Signifikanzberechnungen. Dabei erfolgt die Interpretation der Reifungskurven im Vergleich der Kulturpräparate mit Zusatz zu denen ohne Zusatz der zytostatischen Substanz.

Die G/E-Indices und Mitoseindices der 4 Versuche werden in den Tabellen III - V einschließlich ihrer Mittelwerte dargestellt, Tabelle VI zeigt die Signifikanzberechnung der Granulopoese. Für die Mitoseindices der Erythropoese konnten keine Signifikanzberechnungen angestellt werden, da zu wenig Mitosen gefunden wurden. Abbildung 5 zeigt die caryologischen Kurven.

Versuch 1: mit einer Knochenmark-Probe bei Lymphogranulotamose

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 1a, Tab. I)

Nach 24 und 72 Stunden fällt durch den Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan eine signifikante Verschiebung der Kurve nach links auf, dies bedeutet eine Verminderung der Proerythroblasten und eine Vermehrung der reifen Erythroblasten durch Busulfan.

Nach 48 Stunden werden in den Kontrollkulturen die basophilen, polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten signifikant stärker vermindert als unter Busulfanzusatz, während die Proerythroblasten und besonders die reifen Erythroblasten weiter durch den Busulfanzusatz vermindert sind.

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 1b, Tab. II)

Die Myeloblasten zeigen nach 24, 48 und 72 Stunden in den Zusatzkulturen eine Vermehrung. Die Promyelocyten bleiben unverändert, wobei ihre Vermehrung nach 48 Stunden ein zufälliges Ergebnis sein mag. Dagegen fällt die signifikante Linksverschiebung aller übrigen Kurven auf, die eine Verminderung der Myelocyten und Metamyelocyten sowie eine Zunahme der Stabkernigen, stärker noch der Segmentkernigen und eosinophilen Segmentkernigen durch den Zusatz von Busulfan bedeutet.

3. Mitosen (Tab. III, IV, VI)

Die Mitosen der roten Reihe lassen kaum eine Aussage zu, da hier zu wenig Mitosen gefunden wurden. In der weißen Reihe sind nach 24 und 72 Stunden etwa gleich viel Mitosen vorhanden. Das Ergebnis nach 48 Stunden, keine Mitosen unter den ausgezählten Zellen der Kontrollkulturen, dagegen eine relativ hohe Anzahl unter dem Zusatz von Busulfan, weicht stark von allen übrigen Ergebnissen ab.

4. G/E-Indices (Tab. V)

Nach 24 und 72 Stunden ergibt sich eine Depression der Granulopoese, nach 48 Stunden keine deutliche Änderung.

ERYTHROPOESE

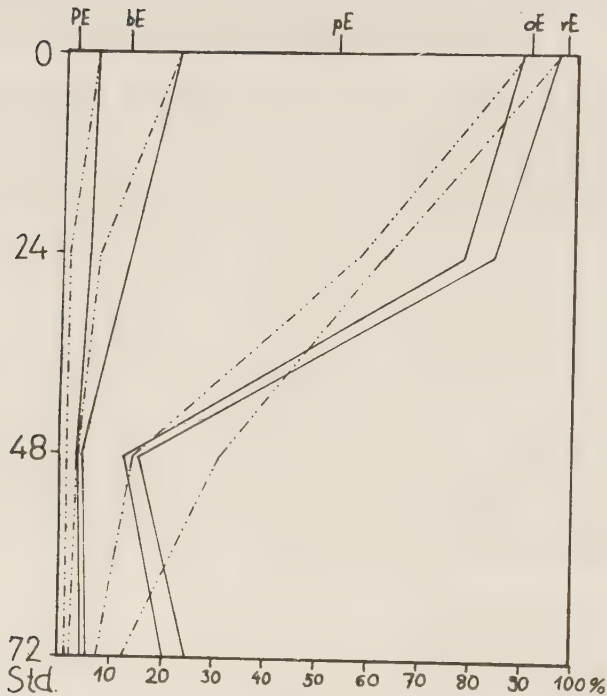


Abb. 1a Reifungskurven, Patientin H.W.

Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Erythropoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt der Gesamtzellbestand der Erythropoese = 100% (planimetrische Darstellung).

Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 10

Kontrolle mit Aceton —————

Zusatz 50µg/ml - - - - -

GRANULOPOESE

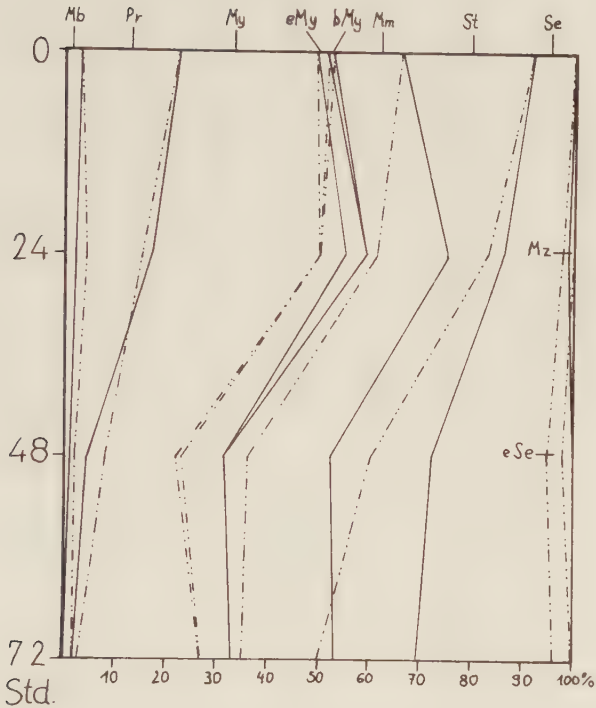


Abb. 1b Reifungskurven, Patientin H.W.

Abszisse: prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen der Granulopoese, addierend aufgetragen. Dabei beträgt der Gesamtzellbestand der Granulopoese = 100% (planimetrische Darstellung).

Ordinate: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 10

Kontrolle mit Aceton ——— Zusatz 50 µg/ml - - - - -

Tabelle I

Erythropoese Fall I, 50µg/ml Busulfan:

	zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ^2
24 h	PE	39	14	27	26	10,1
	bE	61	57	61	57	0,0001
	pE	511	474	501	475	0,007
	oE	48	43	47	44	0,04
	rE	129	347	246	230	<u>115,72</u>
						$\chi^2 = 125,903 \quad P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
48 h	PE	24	6	17	12	6,63
	bE	9	19	15	12	6,87
	pE	59	52	62	48	0,56
	oE	22	79	57	44	50,13
	rE	640	420	600	459	<u>5,86</u>
						$\chi^2 = 70,07 \quad P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
72 h	PE	23	14	15	21	7,07
	bE	7	11	7	10	0,02
	pE	108	47	63	91	53,97
	oE	29	46	30	44	0,12
	rE	516	882	568	829	<u>8,26</u>
						$\chi^2 = 69,46 \quad P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)

Tabelle II

Granulopoese Fall I, 50µg/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	Mb	20	27	26	21	3,39
	Pr	143	83	126	100	4,97
	My	349	259	339	268	0,55
	eMy	33	2	19	15	20,91
	bMy	3	0	2	1	2,36
	Mm	151	79	128	101	8,86
	St	98	166	147	116	37,78
	Se	126	113	133	105	0,98
	eSe	8	12	11	8	2,05
	Mz	9	2	6	5	$\chi^2 = \frac{2,99}{84,89}$
						$p < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
48 h	Mb	14	17	16	14	0,79
	Pr	34	67	53	47	15,38
	My	317	149	247	218	41,47
	eMy	0	5	3	3	5,67
	bMy	0	1	0	0	1,13
	Mm	234	132	194	171	17,12
	St	229	245	251	222	4,43
	Se	329	355	363	320	6,97
	eSe	5	27	17	14	18,08
	Mz	6	22	14	13	$\chi^2 = \frac{11,3}{122,49}$
						$p < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
72 h	Mb	6	18	12	11	7,30
	Pr	29	11	21	18	6,38
	My	390	270	346	313	11,34
	eMy	2	6	4	1	2,43
	bMy	0	2	1	1	2,21
	Mm	242	89	173	157	56,15
	St	197	168	191	173	0,29
	Se	381	525	476	429	39,98
	eSe	6	43	25	23	31,91
	Mz	7	6	6	6	$\chi^2 = \frac{0,008}{158,05}$
						$p < 10^{-10}$ (hoch signifikant)

Indices-Tabelle III - V

III. Mitoseindices der Erythropoese in ‰ angegeben:

Ver- such	Original- präparat	Kontrollen			25µg/ml			50µg/ml		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	5,3	6,1	0	0				0	0	0
II	15,5	31,2	18,7	0	23,6	0	0	17,4	0	0
III	26,7	16	28	20	2,4	0	0	0	0	0
IV	39,1	8,8	0	5,7	8,1	0	0	6,5	0	0
Mittel- werte										
I-IV	21,6	15,5	11,7	6,4				6	0	0
II-IV	27,1	18,7	15,6	8,6	11,4	0	0	8	0	0

IV. Mitoseindices der Granulopoese in ‰ angegeben:

Ver- such	Original- präparat	Kontrollen			25µg/ml			50µg/ml		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	17	9	0	4				7	17	5
II	16,3	8,7	21,8	14,5	3,1	8,7	13,8	7,5	4,7	16
III	23,8	12,2	11,2	8,8	7,8	6,8	6,5	11,4	6	6,6
IV	18,4	14,7	7	8,8	11,3	6,8	12,9	4,5	6,1	10,4
Mittel- werte										
I-IV	18,9	11,1	10	9				7,6	8,5	9,5
II-IV	19,5	11,9	13,3	10,7	7,4	7,4	11,1	7,8	5,6	11

V. G/E-Indices:

Ver- such	Original- präparat	Kontrollen			25µg/ml			50µg/ml		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
I	1,4	1,2	1,5	1,8				0,8	1,8	1,2
II	6,2	5,2	4,2	3,6	7,7	3	6,1	3,9	5,1	2,9
III	3,3	2,3	1,9	2,2	1,8	1,3	1,7	2,3	3,3	0,9
IV	3,4	1,9	2	1,2	1,7	2,6	1,1	1,3	1,2	1,1
Mittel- werte										
	3,6	2,6	2,4	2,2	3,8	2,3	3	2,1	2,6	1,5

Tabelle VI

Granulopoese: Zusammenfassung der Mitose-Indices aller Patienten

a) mit 25µg/ml Busulfan

25 h	K	P	Z	K	q	Z	χ^2
Versuch II	8,7		3,1	7,2		4,5	0,73
Versuch III	12,2		7,8	12,3		7,6	0,003
Versuch IV	14,7		11,3	16		9,9	<u>0,28</u>

$$\chi^2 = 1,01 \quad P = 0,6$$

(nicht signifikant)

48 h	K	P	Z	K	q	Z	χ^2
Versuch II	21,8		8,7	19,5		10,9	0,73
Versuch III	11,2		6,8	11,5		6,5	0,02
Versuch IV	7		6,8	8,8		4,9	<u>1,05</u>

$$\chi^2 = 1,82 \quad P = 0,4$$

(nicht signifikant)

72 h	K	P	Z	K	q	Z	χ^2
Versuch II	14,5		13,8	13,9		14,3	0,04
Versuch III	8,8		6,5	7,5		7,7	0,42
Versuch IV	8,8		12,9	10,6		11	<u>0,34</u>

$$\chi^2 = 1,12 \quad P = 0,58$$

(nicht signifikant)

b) mit 50 μ g/ml Busulfan

24 h	K	P	Z	K	q	Z	χ^2
Versuch I	9		7	9,5		6,4	0,06
Versuch II	8,7		7,5	9,6		6,5	0,22
Versuch III	12,2		11,4	14		9,5	0,59
Versuch IV	14,7		4,5	11,4		7,8	<u>2,23</u>

$$\chi^2 = 3,21 \quad P = 0,36$$

(nicht signifikant)

48 h	K	Z	K	Z	χ^2
Versuch I	0	17	9,2	7,7	20,11
Versuch II	21,8	4,7	14,3	12,1	8,41
Versuch III	11,2	6	9,3	7,8	0,82
Versuch IV	7	6,1	7,1	5,9	<u>0,003</u>

$$\chi^2 = 29,35 \quad P = 10^{-6}$$

(hoch signifikant)

72 h	K	Z	K	Z	χ^2
Versuch I	4	5	4,3	4,6	0,06
Versuch II	14,5	16	14,8	15,6	0,02
Versuch III	8,8	6,6	7,5	7,8	0,44
Versuch IV	8,8	10,4	9,3	9,8	<u>0,06</u>

$$\chi^2 = 0,58 \quad P = 0,65$$

(nicht signifikant)

Versuch 2 mit dem Knochenmark eines Patienten mit Peritonealkarzinose bei Adeno-Carcinom

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 2a, Tab. VII)

Während das Originalpräparat noch 9% Proerythroblasten enthält, sind in allen Kulturen weniger als 1% vorhanden.

a) Kulturen mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan:

Die Zahl der basophilen Erythroblasten ist in keiner Zusatzkultur signifikant verändert. Nach 24 Stunden erfahren auch die anderen Zellarten keine signifikante Veränderung in den Zusatzkulturen. Die polychromatischen, oxyphilen und reifen Erythroblasten treten nach 48 Stunden signifikant vermindert auf, nach 72 Stunden sind die oxyphilen und reifen Erythroblasten vermehrt.

b) Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan:

Die Zahl der basophilen Erythroblasten ist auch hier in keiner der Zusatzkulturen signifikant verändert. Die polychromatischen Erythroblasten nehmen nach 24 Stunden ab, die oxyphilen und reifen zu. Nach 48 Stunden verändert sich die Zellzahl der polychromatischen nicht, die oxyphilen sind vermindert, die reifen vermehrt, und nach 72 Stunden treten die polychromatischen und oxyphilen vermindert, die reifen vermehrt auf.

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 2b, Tab. VIII, IX)

a) Kulturen mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan:

Abgesehen von der geringfügigen Promyelocytenvermehrung im 48-Stunden-Präparat zeigen die Kurven der Zusatzkulturen eine deutliche Linksverschiebung gegen die der Kontrollkulturen, was einer Abnahme der teilungsfähigen Zellen und einer Zunahme der ausgereiften entspricht. Dabei erfahren die Myelocyten und die Segmentkernigen die signifikant stärksten Abweichungen, wobei die Myelocyten nach 48 Stunden maximal vermindert, die Segmentkernigen bereits nach 24 Stunden maximal vermehrt sind. Die Myeloblasten und Promyelocyten treten nach 72 Stunden mit der stärksten Abweichung auf.

b) Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan:

Hier tritt nach 24 Stunden eine Vermehrung der Myelocyten auf, die Myeloblasten und Promyelocyten sind bereits nach 24 Stunden maximal und signifikant vermindert. Sonst zeigen sich in den Kurven der Zusatzkulturen die gleichen Linksverschiebungen wie mit der schwächeren Konzentration, wobei auffällt, daß die Zellveränderungen nach 24 und 48 Stunden signifikant stärker ausgeprägt sind, während nach 72 Stunden die Konzentration von 25 μ g/ml Busulfan eine stärkere Wirkung hat.

3. Mitosen (Tab. III, IV, VI)

In beiden Zusatzkulturen der roten Reihe wurden wieder sehr wenig Mitosen gezählt, ab 48 Stunden waren unter Busulfan-Zusatz keine Mitosen mehr vorhanden. Die Mitoseindices der Granulopoese mit der geringen Busulfankonzentration liegen in den drei Zusatzkulturen deutlich unter den Werten der Kontrollkulturen. Dies trifft auch für die Mitoseindices der Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml nach 24 und 48 Stunden zu, nach 72 Stunden steigt der Mitoseindex hier jedoch an. Der niedrigste Mitoseindex kommt in den Kulturen mit 25 μ g/ml nach 24 Stunden, in denen mit 50 μ g/ml Busulfan nach 48 Stunden vor. Die stärkere Busulfan-Konzentration bewirkt keine stärkere Verminderung des Mitoseindex.

4. G/E-Indices (Tab. V)

Nach 24 und 72 Stunden zeigt sich mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan eine Depression der Erythropoese, nach 48 Stunden der Granulopoese. Die stärkere Busulfankonzentration ergibt eine stärkere Schädigung der Granulopoese nach 24 und 72, der Erythropoese nach 48 Stunden.

ERYTHROPOESE

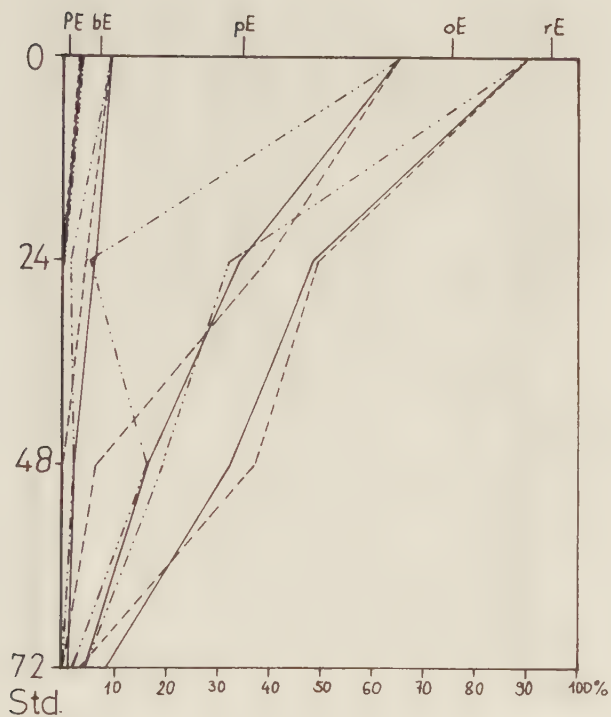


Abb. 2a Reifungskurven, Patientin F.B.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a

Kontrolle mit Aceton ———

Zusatz 25µg/ml - - - - -

Zusatz 50µg/ml — · · — · · —

GRANULOPOESE

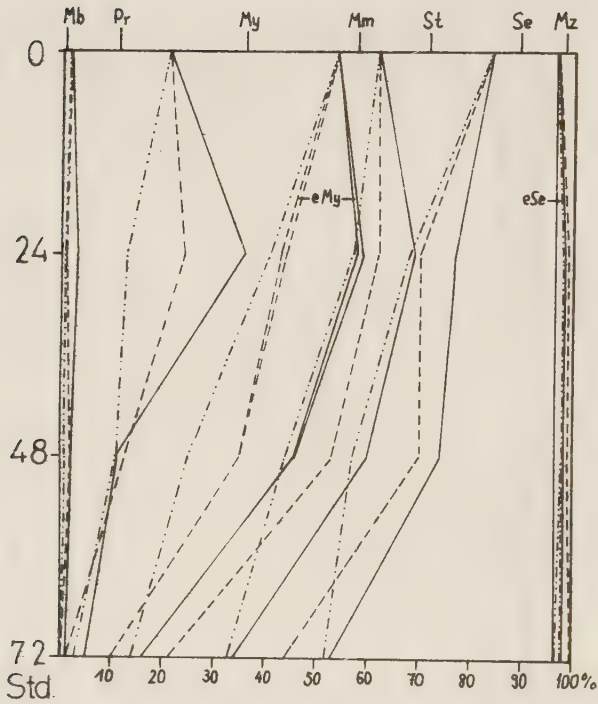


Abb. 2b Reifungskurven, Patientin F.B.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1b

Kontrolle mit Aceton — Zusatz 25µg/ml - - - - -
Zusatz 50µg/ml - -

Tabelle VII

Erythropoese Fall 2, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ^2
24 h	PE	2	1	1	1	0,16
	bE	14	9	12	10	0,3
	pE	92	91	100	82	1,77
	oE	45	26	39	31	1,93
	rE	167	133	165	134	<u>0,02</u>
						$\chi^2 = 4,19 \quad P = 0,38$ (nicht signifikant)
48 h	PE	2	0	1	1	2,55
	bE	3	2	2	2	0,52
	pE	46	11	29	38	15,51
	oE	55	133	82	105	16,45
	rE	231	273	221	282	<u>0,73</u>
						$\chi^2 = 45,78 \quad P = 10^{-9}$ (hoch signifikant)
72 h	bE	3	0	2	1	1,79
	pE	21	8	18	11	1,20
	oE	14	0	9	5	8,38
	rE	415	264	424	254	<u>0,58</u>
						$\chi^2 = 11,97 \quad P = 0,007$ (signifikant)

Erythropoese Fall 2, 50 μ g/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	PE	2	4	2	3	0,44
	bE	14	1	7	6	12,93
	pE	92	12	48	55	71,80
	oE	45	97	66	75	13,34
	rE	167	246	194	218	<u>7,12</u>
						$\chi^2 = 105,65$
						$P = 10^{-10}$
						(hoch signifikant)
48 h	PE	2	0	1	1	1,62
	bE	3	4	4	3	0,43
	pE	46	39	46	38	0,04
	oE	55	9	35	11	24,38
	rE	231	221	249	202	<u>3,13</u>
						$\chi^2 = 29,11$
						$P = 10^{-5}$
						(hoch signifikant)
72 h	bE	3	0	1	1	2,98
	pE	21	8	14	14	5,74
	oE	14	8	11	10	1,59
	rE	415	435	426	423	<u>0,61</u>
						$\chi^2 = 10,93$
						$P = 0,01$
						(zweifelhaft signifikant)

Tabelle VIII

Granulopoese Fall 2, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ ²
24 h	Mb	47	24	32	38	12,37
	Pr	551	462	460	552	32,93
	My	358	383	336	404	2,51
	eMy	14	19	15	18	0,12
	Mm	172	365	243	293	38,81
	St	135	157	132	159	0,08
	Se	335	555	404	485	21,69
	eSe	18	12	13	16	2,57
	Mz	29	17	20	25	<u>5,76</u>
χ ² = 116,87 P < 10 ⁻¹⁰ (hoch signifikant)						
48 h	Mb	33	25	30	27	0,46
	Pr	132	140	142	129	1,63
	My	503	290	415	377	38,66
	Mm	203	179	200	181	0,08
	St	201	224	222	202	4,44
	Se	325	371	364	331	9,08
	eSe	11	1	6	5	9,99
	Mz	21	18	10	18	<u>0,03</u>
	χ ² = 64,40 P < 10 ⁻¹⁰ (hoch signifikant)					
72 h	Mb	15	1	8	8	12,50
	Pr	64	23	43	44	20,05
	My	180	148	162	165	3,71
	eMy	0	5	2	2	4,91
	Mm	290	184	234	239	25,62
	St	304	373	335	341	5,86
	Se	715	907	803	818	19,45
	eSe	19	8	13	13	4,67
	Mz	36	3	19	19	<u>28,51</u>
χ ² = 124,92 P < 10 ⁻¹⁰ (hoch signifikant)						

Tabelle IX

Granulopoese Fall 2, 50 μ g/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	Mb	47	11	31	62	17,06
	Pr	551	168	388	330	148,23
	My	358	388	402	343	10,86
	eMy	14	0	7	6	11,92
	Mm	172	230	217	184	20,36
	St	135	160	159	135	8,06
	Se	335	427	411	350	30,92
	eSe	18	2	11	9	10,43
	Mz	29	27	30	25	<u>0,11</u>
						$\chi^2 = 257,59$
						$P < 10^{-10}$
						(hoch signifikant)
48 h	Mb	33	15	24	23	6,43
	Pr	132	134	134	131	0,07
	My	503	182	345	339	144,82
	Mm	203	272	239	235	11,27
	St	201	181	192	189	0,72
	Se	325	575	453	446	73,93
	eSe	11	5	8	7	2,14
	Mz	21	33	27	26	<u>2,88</u>
						$\chi^2 = 242,48$
						$P < 10^{-10}$
						(hoch signifikant)
72 h	Mb	15	2	9	7	7,27
	Pr	64	42	59	46	0,92
	My	180	137	176	140	0,14
	eMy	0	9	5	5	11,33
	Mm	290	247	299	237	0,65
	St	304	239	302	240	0,01
	Se	715	575	781	571	0,04
	eSe	19	13	17	14	0,17
	Mz	36	25	33	27	<u>0,26</u>
						$\chi^2 = 20,83$
						$P = 0,01$
						(zweifelhaft signifikant)

Versuch 3 mit dem Knochenmark eines Patienten mit Pleuropneumonie re, Diabetes mellitus, chronischer Hepatitis

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 3a, Tab. XV)

Alle Kulturen enthalten wenig teilungsfähige Erythroblasten, die basophilen Erythroblasten beider Busulfan-Kulturen erfahren keine signifikante Änderung.

a) Kulturen mit dem Zusatz von $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan:

Die Kurven der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten der Busulfankulturen zeigen nach 24, 48 und 72 Stunden eine Linksverschiebung, das entspricht einer Verminderung der polychromatischen, einer Vermehrung der oxyphilen Erythroblasten. Die reifen Erythroblasten treten nach 48 Stunden vermehrt auf, nach 72 Stunden sogar signifikant.

b) Kulturen mit dem Zusatz von $50\mu\text{g/ml}$ Busulfan:

Die polychromatischen Erythroblasten der Zusatzkulturen sind nach 24, 48 und 72 Stunden vermindert. Die oxyphilen zeigen nach 24 und 72 Stunden eine Zunahme, nach 48 Stunden eine Abnahme, während die reifen Erythroblasten in allen Zusatzkulturen vermehrt auftreten.

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 3b, Tab. XI, XII)

a) Kulturen mit dem Zusatz von $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan:

Die Kurven der 24-Stunden-Zusatzpräparate weisen eine deutliche Rechtsverschiebung auf, nach 48 und 72 Stunden sind sie dagegen eindeutig nach links verschoben. Das bedeutet nach 24 Stunden eine Zunahme der unreifen und eine Abnahme der ausgereiften Zellen, nach 48 und 72 Stunden eine Verminderung der unreifen und eine Vermehrung der reifen, also eine Zunahme der Stimulation in vitro. Dabei weisen nach 24 Stunden die Promyelocyten und Stabkernigen die stärksten Abweichungen auf, nach 48 Stunden sind besonders die Zahl der Promyelocyten und Stabkernigen erniedrigt, die Zahl der Metamyelocyten und eosinophilen Segmentkernigen erhöht. Nach 72 Stunden liegt die größte Abweichung bei den Myelocyten und Segmentkernigen.

b) Kulturen mit dem Zusatz von $50\mu\text{g/ml}$ Busulfan:

Mit dieser Konzentration zeigt sich in den Zusatzpräparaten nach 24 und 48 Stunden zwar das gleiche Bild wie unter a): Die allgemeine Rechtsverschiebung der Kurven nach 24 Stunden ist hier jedoch nicht signifikant, und die Linksverschiebung nach 48 Stunden tritt mit dieser Konzentration signifikant stärker auf. Nach 72 Stunden ist die Linksverschiebung mit $50\mu\text{g/ml}$ Busulfan weniger ausgeprägt als mit der $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan-Konzentration; jetzt sind zwar die Myeloblasten und Promyeloblasten vermindert sowie die Metamyelocyten und Segmentkernigen vermehrt, es fällt aber auch die recht starke Zunahme der Myelocyten auf.

3. Mitosen (Tab. III, IV, VI)

Die Kultur mit dem Zusatz von $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan zeigt nach 24 Stunden einige Mitosen der Erythropoese, deren Zahl weit unter denen der zugehörigen Kontrollkultur liegt; in allen übrigen Zusatzkulturen wurden keine teilungsfähigen Mitosen gefunden, was einen erheblichen Rückgang der Erythroblasten unter Busulfaneinfluß bedeutet.

Die Mitoseindices der Granulopoese liegen bei beiden Busulfankonzentrationen unter den Werten der Kontrollkulturen, wobei die größte Differenz nach 48 Stunden auftritt. Eine unterschiedliche Beeinflussung durch die Stärke der Konzentration liegt nicht vor.

4. G/E-Indices (Tab. V)

Alle Kulturen mit dem Zusatz von $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan zeigen eine Depression der Granulopoese. Nach 24 Stunden liegt bei der stärkeren Konzentration keine Veränderung vor, nach 48 Stunden wird die Erythropoese, nach 72 Stunden die Granulopoese stärker vermindert.

ERYTHROPOESE

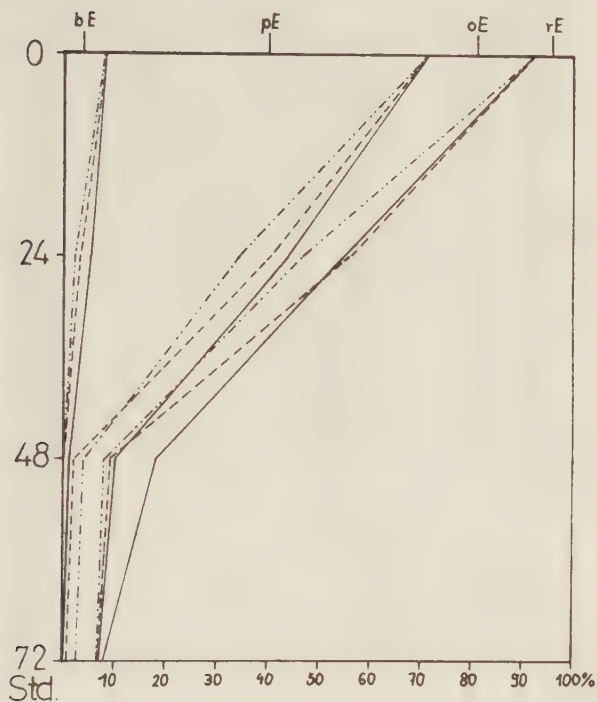


Abb. 3a Reifungskurven, Patient E.F.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a

Kontrolle mit Aceton ———

Zusatz 25 μ g/ml - - - - -

Zusatz 50 μ g/ml — · — · —

GRANULOPOESE

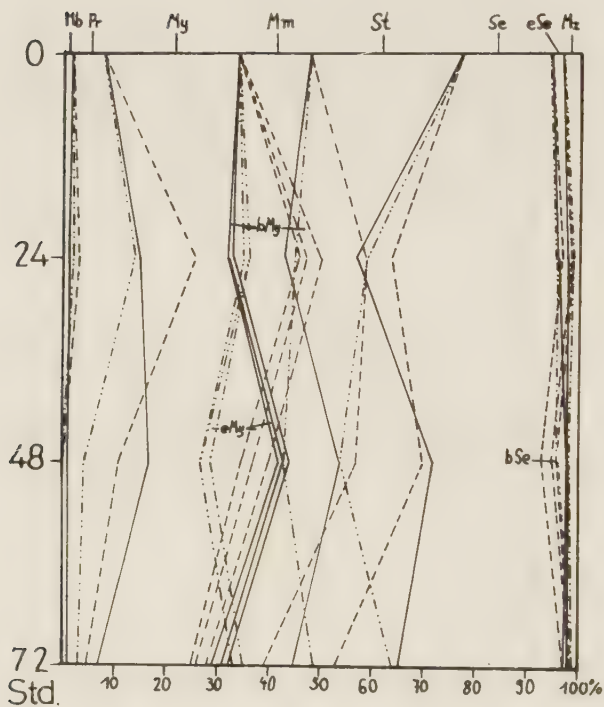


Abb. 3b Reifungskurven, Patient E.F.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1b

Kontrolle mit Aceton ———

Zusatz 25µg/ml - - - - -

Zusatz 50µg/ml — • — • —

Tabelle X

Erythropoese Fall 3, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	PE	3	3	2	3	0,18
	bE	28	19	20	26	4,62
	pE	223	269	216	275	0,35
	oE	61	116	77	99	6,52
	rE	255	316	251	319	<u>0,10</u>
						$\chi^2 = 11,81 \quad P = 0,017$ (nicht signifikant)
48 h	PE	2	1	1	1	0,63
	bE	6	0	3	3	7,68
	pE	52	17	30	38	27,81
	oE	46	55	44	56	0,11
	rE	490	690	517	662	<u>2,60</u>
						$\chi^2 = 38,85 \quad P = 10^{-7}$ (hoch signifikant)
72 h	bE	1	1	1	1	0,006
	pE	46	5	24	26	37,7
	oE	3	41	20	23	28,84
	rE	583	660	587	655	<u>0,05</u>
						$\chi^2 = 66,67 \quad P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)

Erythropoese Fall 3, 50µg/ml Busulfan

	Zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ^2
24 h	PE	3	5	4	4	0,43
	bE	28	4	15	16	18,76
	pE	223	189	202	209	3,96
	oE	61	75	67	69	1,04
	rE	255	313	279	288	<u>4,25</u>
						$\chi^2 = 28,45 \quad P = 10^{-5}$ (hoch signifikant)
48 h	PE	2	0	1	1	1,58
	bE	6	0	3	3	4,74
	pE	52	20	40	31	7,82
	oE	46	20	36	29	5,12
	rE	490	431	514	406	<u>2,63</u>
						$\chi^2 = 21,90 \quad P = 0,0003$ (hoch signifikant)
72 h	bE	1	0	0	1	1,55
	pE	46	30	29	46	14,47
	oE	3	39	16	25	18,12
	rE	583	912	586	908	<u>0,03</u>
						$\chi^2 = 35,18 \quad P = 10^{-6}$ (hoch signifikant)

Tabelle XI

Granulopoese Fall 3, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	Mb	18	38	28	27	7,46
	Pr	184	304	245	242	31,47
	My	217	263	241	238	5,18
	eMy	7	17	12	11	4,32
	bMy	18	40	29	28	8,7
	Mm	139	121	131	128	0,97
	St	197	75	128	125	40,93
	Se	509	430	473	465	5,43
	eSe	27	27	27	26	0,003
	bSe	0	9	4	4	9,1
	Mz	27	16	21	21	$\frac{2,63}{116,28}$
						$P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
48 h	Mb	13	5	9	8	2,72
	Pr	176	105	148	132	10,92
	My	289	244	281	251	0,43
	eMy	12	17	15	13	1,51
	bMy	13	28	21	19	7,31
	Mm	118	176	155	138	18,88
	St	200	135	176	158	6,42
	Se	283	226	268	240	1,61
	eSe	5	22	14	12	12,72
	bSe	2	10	6	5	6,28
	Mz	23	37	31	28	$\frac{5,03}{73,88}$
						$P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
72 h	Mb	15	1	8	5	11,02
	Pr	81	58	72	66	1,99
	My	282	229	267	243	1,72
	eMy	19	15	17	16	0,17
	bMy	10	18	14	13	3,08
	Mm	171	125	154	141	3,57
	St	256	163	219	199	13,04
	Se	405	508	477	435	22,98
	eSe	13	28	21	19	6,95
	bSe	0	3	1	1	3,28
	Mz	0	11	5	5	<u>12,05</u>

$$\chi^2 = 79,89 \quad p < 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

Tabelle XII

Granulopoese Fall 3, 50µg/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	Mb	18	21	19	20	0,13
	Pr	184	162	169	176	2,34
	My	217	277	242	251	5,22
	eMy	7	5	6	6	0,41
	bMy	18	14	16	16	0,66
	Mm	139	129	131	136	0,83
	St	179	197	184	181	0,32
	Se	509	502	496	514	0,66
	eSe	27	37	31	32	1,21
	bSe	0	5	2	2	4,81
	Mz	30	16	22	23	5,44

$$\chi^2 = 22,06 \quad P = 0,025$$

(nicht signifikant)

48 h	Mb	13	5	7	10	6,47
	Pr	176	57	99	133	103,51
	My	289	357	275	370	1,23
	eMy	12	27	16	22	2,22
	bMy	13	6	8	10	5,19
	Mm	118	208	138	187	5,43
	St	200	170	157	212	19,92
	Se	283	643	394	531	54,69
	eSe	5	27	13	18	9,50
	bSe	2	0	1	1	2,69
	Mz	25	32	24	32	0,71

$$\chi^2 = 211,60 \quad P < 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
72 h	Mb	15	1	9	6	8,32
	Pr	81	28	63	45	11,67
	My	282	269	320	230	11,05
	eMy	19	20	22	16	1,43
	bMy	10	0	6	4	7,19
	Mm	171	130	175	125	0,23
	St	256	132	225	162	9,73
	Se	405	321	422	303	1,69
	eSe	13	3	9	6	3,50
	Mz	30	8	22	16	<u>9,37</u>

$$\chi^2 = 64,21 \quad p = 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

Versuch 4 mit dem Knochenmark eines Patienten mit sideroachrestischer Anämie und Thrombopenie

1. Reifungskurve der Erythropoese (Abb. 4a, Tab. XIII).

Die Anzahl der Proerythroblasten beträgt in allen Kulturen weniger als 1 %.

a) Kulturen mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan:

Nach 24,48 und 72 Stunden verschieben sich alle Kurven hochsignifikant nach links, was einer Abnahme der basophilen und besonders der polychromatischen sowie einer Zunahme der oxyphilen und reifen Erythroblasten entspricht. Dies ist besonders nach 48 und 72 Stunden ausgeprägt, die signifikant stärkste Vermehrung der oxyphilen zeigt sich nach 72 Stunden, die der reifen Erythroblasten bereits nach 24 Stunden.

b) Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan:

Wie unter a) zeigt sich auch hier die Linksverschiebung aller Kurven mit denselben Zellveränderungen, die mit dieser Konzentration nach 24 und 48 Stunden eine größere Signifikanz, nach 72 Stunden eine kleinere aufweist. Die maximale Veränderung gegen die Kontrollkulturen liegt bei den basophilen nach 24, den polychromatischen Erythroblasten nach 48 Stunden; die größte Zunahme der oxyphilen nach 72 Stunden und der reifen nach 24 Stunden ist auch hier zu beobachten.

2. Reifungskurve der Granulopoese (Abb. 4b, Tab. XIV, XV)

a) Kulturen mit dem Zusatz von 25 μ g/ml Busulfan:

Auffallend ist die deutlich signifikante Linksverschiebung der Kurven in allen Kulturen unter Zusatz von Busulfan: Myeloblasten, Promyelocyten und Myelocyten sind in allen Zusatzkulturen vermindert, Metamyelocyten, Stab- und Segmentkernige vermehrt. Die Zellverminderung der Myelocyten ist nach 72, die Vermehrung der Segmentkernigen nach 48 und 72 Stunden ausgeprägt.

b) Kulturen mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan:

Nach 24 Stunden fällt durch Zugabe von Busulfan die Zunahme

der Promyelocyten, sowie die Abnahme der Segmentkernigen auf, die Myeloblasten und Myelocyten sind vermindert, die Matamyelocyten und Stabkernigen vermehrt. Nach 48 und 72 Stunden nehmen die unreifen Zellen stärker ab und die reifen stärker zu, wobei die Myelocyten nach 72 Stunden, die Segmentkernigen nach 48 und 72 Stunden stark beeinflusst werden. In diesem Versuch zeigt die Signifikanzberechnung in allen Kulturen mit der höheren Busulfankonzentration eine geringere Wirkung.

3. Mitosen (Tab. III, IV, VI)

In der Erythropoese wurden unter Busulfan nur in den 24-Stunden-Kulturen einige Mitosen gefunden: die Mitoseindices der Zusatzkulturen lagen weit unter denen der Kontrollkulturen. Die Granulopoese beider Busulfankulturen zeigt nach 24 und 48 Stunden einen erniedrigten, nach 72 Stunden einen erhöhten Mitoseindex.

4. G/E-Indices (Tab. V)

Mit dem Zusatz von $25\mu\text{g/ml}$ Busulfan ergibt sich erst nach 72 Stunden eine schwache Depression der Granulopoese, nach 48 Stunden ist die Erythropoese stärker vermindert. Der Zusatz von $50\mu\text{g/ml}$ Busulfan zeigt in allen Kulturen eine schwache Depression der Granulopoese.

ERYTHROPOESE

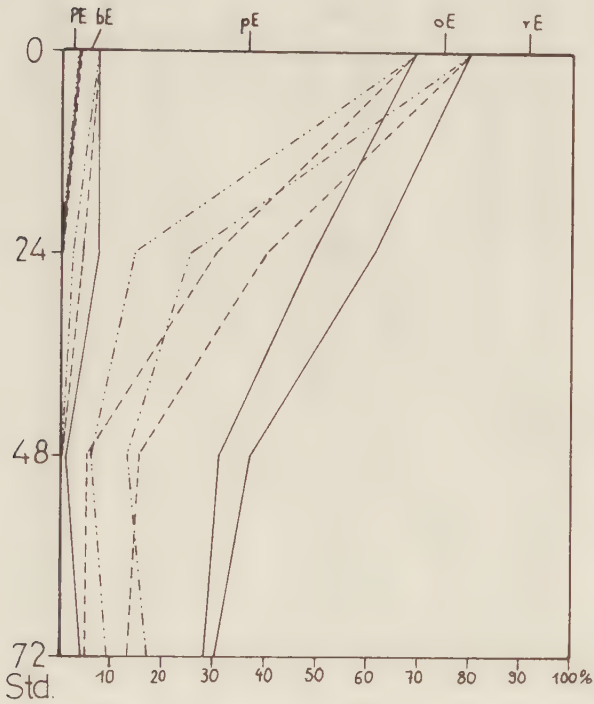


Abb. 4a Reifungskurven, Patientin E.N.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1a

Kontrolle mit Aceton ———

Zusatz 25 μ g/ml -----

Zusatz 50 μ g/ml - . . - . . -

GRANULOPOESE

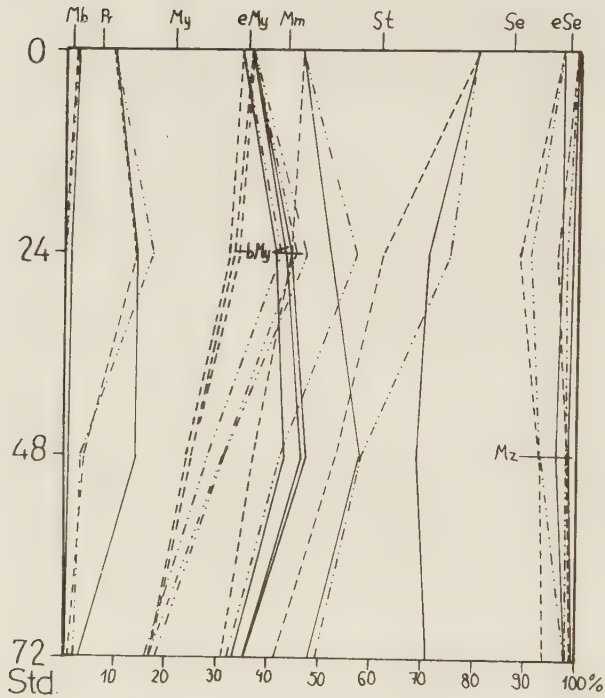


Abb. 4b Reifungskurven, Patientin E.N.

Zeichenerklärung siehe Abb. 1b

Kontrolle mit Aceton ————— Zusatz mit 25µg/ml - - - - -
Zusatz mit 50µg/ml - · - · - · -

Tabelle XIII

Erythropoese Fall 4, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ^2
24 h	PE	3	4	3	3	0,07
	bE	33	19	24	27	5,03
	pE	236	162	190	207	20,67
	oE	69	63	63	68	1,01
	rE	221	373	284	309	<u>27,28</u>
						$\chi^2 = 54,06$ $P = 10^{-10}$ (hoch signifikant)
48 h	PE	2	1	1	1	0,21
	bE	3	1	2	1	0,75
	pE	156	21	94	82	86,03
	oE	33	45	41	36	3,82
	rE	331	391	385	336	<u>16,35</u>
						$\chi^2 = 107,18$ $P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)
72 h	PE	3	1	1	2	1,41
	bE	18	0	8	9	21,63
	pE	142	35	80	47	86,50
	oE	11	55	29	36	22,00
	rE	406	606	459	552	<u>11,46</u>
						$\chi^2 = 143,03$ $P < 10^{-10}$ (hoch signifikant)

Tabelle XIV

Granulopoese Fall 4, 25µg/ml Busulfan

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
24 h	Mb	16	1	10	7	9,57
	Pr	137	112	141	107	0,37
	My	278	146	241	182	12,84
	eMy	18	6	13	10	3,18
	bMy	16	6	12	9	2,23
	Mm	90	81	97	73	1,29
	St	197	144	194	146	0,09
	Se	265	210	270	204	0,26
	eSe	16	57	41	31	36,53
	bSe	2	0	1	1	1,51
	Mz	10	27	21	15	13,51

$$\chi^2 = 81,44 \quad P < 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

48 h	Mb	9	0	4	5	10,5
	Pr	135	46	83	97	58,93
	My	299	229	243	284	23,37
	eMy	32	15	21	25	9,11
	bMy	9	4	6	7	2,78
	Mm	112	142	117	136	0,42
	St	108	198	141	164	14,48
	Se	280	474	347	406	24,60
	eSe	21	63	38	45	15,10
	Mz	17	22	18	21	0,10

$$\chi^2 = 159,43 \quad P < 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

	Zell- typ	p		q		χ^2
		K	Z	K	Z	
72 h	Mb	4	0	2	2	4,19
	Pr	19	6	12	13	7,41
	My	212	118	161	168	31,54
	eMy	16	4	10	10	7,79
	bMy	3	1	2	2	1,10
	Mm	92	103	95	99	0,20
	St	167	79	120	125	35,91
	Se	193	404	291	305	64,73
	eSe	12	34	22	23	9,48
	bSe	0	1	0	0	0,95
	Mz	7	11	8	9	0,70

$\chi^2 = 164,05 \quad p < 10^{-10}$
(hoch signifikant)

Tabelle XV

Granulopoese Fall 4, 50µg/ml Busulfan

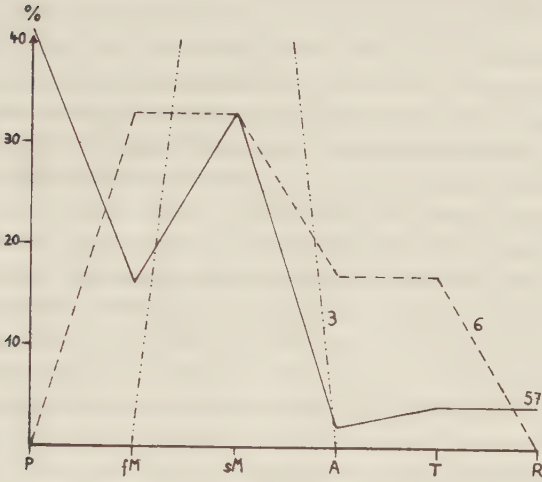
	Zell- typ	K ^p	Z	K ^q	Z	χ ²
24 h	Mb	16	4	11	8	4,16
	Pr	137	127	151	112	3,33
	My	278	194	271	200	0,40
	eMy	18	25	24	18	4,27
	bMy	16	17	19	14	1,08
	Mm	90	73	93	69	0,33
	St	197	141	194	143	0,09
	Se	265	118	220	162	21,59
	eSe	16	54	40	29	34,26
	bSe	2	2	2	1	0,09
	Mz	10	19	16	12	<u>6,25</u>
						χ ² = 75,90 p < 10 ⁻¹⁰ (hoch signifikant)
48 h	Mb	9	4	7	5	0,84
	Pr	135	22	88	23	55,23
	My	299	195	279	214	3,11
	eMy	32	20	29	22	0,51
	bMy	9	2	6	1	2,85
	Mm	112	84	110	85	0,02
	St	108	128	133	102	11,26
	Se	280	270	311	238	7,22
	eSe	21	42	35	27	13,87
		Mz	17	17	19	14
						χ ² = 95,54 p < 10 ⁻¹⁰ (hoch signifikant)

	Zell- typ	K	Z	K	Z	χ^2
72 h	Mb	4	0	2	1	3,26
	Pr	19	10	15	13	1,27
	My	212	82	161	132	34,41
	eMy	16	8	13	10	1,29
	bMy	3	6	5	4	1,72
	Mm	92	85	97	79	0,69
	St	167	100	147	119	5,99
	Se	193	282	261	213	40,14
	eSe	12	2	7	6	5,30
	bSe	0	4	2	2	4,90
	Mz	7	12	10	8	2,55

$$\chi^2 = 101,57 \quad P < 10^{-10}$$

(hoch signifikant)

rote Mitosen



weiße Mitosen

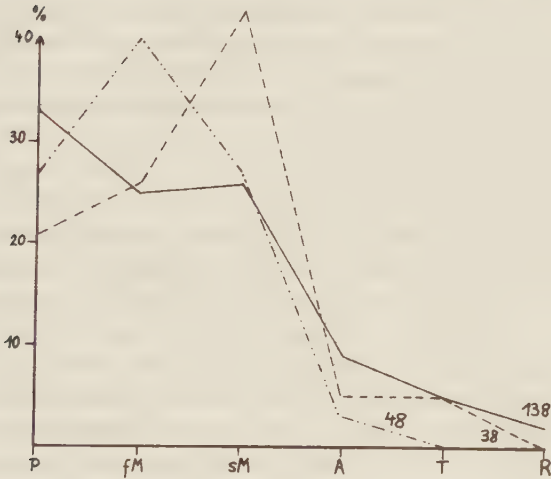


Abb. 5 Caryologische Kurven

Abszisse: Mitosephasen

Ordinate: Mitosezahl, angegeben in %

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Erythropoese

Die Reifungskurven und G/E-Indices zeigen nach 24 Stunden eine beschleunigte Reifung, die besonders deutlich bei der Sideroachrestischen Anämie (Versuch 4) auftritt; und zwar tritt dieser Effekt stärker bei 50 μ g/ml als bei 25 μ g/ml Busulfan-Zusatz ein.

In den Zusatzpräparaten wurden so wenig Mitosen gefunden, daß hier eine erhebliche Regenerationsverminderung vorliegt und aus den caryologischen Kurven keine Aussage gemacht werden kann.

2. Granulopoese

Auch hier erfahren die Reifungskurven mit 50 μ g/ml eine stärkere Linksverschiebung als mit 25 μ g/ml, wenngleich insgesamt etwas unübersichtlicher. Das bedeutet einen Fortfall der Vermehrung teilungsfähiger Zellen durch Mitoseverminderung nach 24 Stunden: Mitoseindices im Mittel von etwa 12% auf etwa 8%. Später tritt eine Reifungsbeschleunigung ein. Trotz der Mitoseverminderung kommt es - wie aus den caryologischen Kurven ersichtlich - zu einer Vermehrung der Metaphasen, was auf eine Verzögerung im Mitoseablauf oder auf das Vorkommen von offenen Endomitosen schließen läßt.

3. Die Mitoseindices liegen sowohl in der Erythropoese als auch nach 24 und 48 Stunden in der Granulopoese unter den Werten der Kontrollkulturen. In der Erythropoese ergibt der Zusatz mit 50 μ g/ml Busulfan nach 24 Stunden eine größere Mitosehemmung als mit dem Zusatz von 25 μ g/ml, nach 48 und 72 Stunden treten in den Zusatzkulturen keine Mitosen mehr auf. In der Granulopoese sind die 48 Stunden-Werte im Versuch 2, 3 und 4 am deutlichsten erniedrigt. Die arithmetischen Mittelwerte aus den Versuchen 2, 3 und 4 lassen eine stärkere Mitosehemmung mit dem Zusatz von 50 μ g/ml Busulfan nach 48 Stunden erkennen. Nach 72 Stunden steigt der Mitoseindex in beiden Zusatzkulturen über den Wert der Kontrollkulturen, nur im 3. Versuch liegt er dann niedriger.

4. Die G/E-Indices entsprechen in den Originalausstrichen den zugehörigen Erkrankungen. Im 1. Versuch liegt eine Lymphogranulomatose mit mäßiger Anaemie bei Natulan^R-Behandlung vor, im Versuch 2 eine Peritonealkarzinose, so daß entsprechend der Reaktion des Knochemarks der G/E-Index im Versuch 2 erhöht, im ersten erniedrigt ist. Die anderen beiden Versuche zeigen normale Ausgangswerte. Die Tabelle der G/E-Indices zeigt besonders mit der niedrigeren Konzentration sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die Mittelwerte von allen Versuchen lassen mit dem 25µg/ml-Zusatz nach 24 und 72 Stunden eine Verminderung der Erythroblasten, nach 24 Stunden keine Veränderung erkennen. Mit der 50µg/ml-Konzentration zeigen die Mittelwerte eine stärkere Schädigung der Granulopoese nach 24 und 72 Stunden, nach 48 Stunden eine schwache Verminderung der Erythropoese.

5. Caryologische Kurven: Bei der Betrachtung der Veränderungen des Verhältnisses der einzelnen Mitosephasen in den Zusatzkulturen zueinander ist es wegen der relativ geringen Anzahl von Mitosen nicht zweckmäßig, von den einzelnen Versuchen caryologische Kurven anzufertigen. Es wurden daher nur Summenkurven der Erythro- und Granulopoese über insgesamt 63 rote und 224 weiße Mitosen aufgestellt. Diese zeigen in der Erythropoese eine Abnahme der Prophasen unter Busulfaneinfluß. In der Granulopoese kommen die frühen und späten Metaphasen vermehrt vor, und zwar mit 25µg/ml Busulfan die frühen, mit 50µg/ml Busulfan mehr die späten Metaphasen; die späteren Mitosephasen sind unter dem Zusatz des Zytostatikums vermindert.

In den vier Versuchen konnten unter Busulfanzusatz weder eine vermehrte Zellschädigung, noch vermehrte Zweikernige oder sonstige morphologische Anomalien festgestellt werden.

Der 10%ige Acetonzusatz in den Kontrollen scheint die Reifung und die Mitosenindices nicht zu beeinflussen, da nur unwesentliche Abweichungen gegen die Ergebnisse von Boll zu verzeichnen sind ^{4,5}.

Diskussion

Der Einfluß von Busulfan auf die Zellen des peripheren Blutes ist in der Literatur bereits ausgiebig an in vivo- und in vitro - Untersuchungen beschrieben worden: so wirkt Busulfan nicht auf die Stimulation der Lymphocyten hemmend ^{1,44}, verursacht aber Chromosomenbrüche ^{20,56}. Hier sollen nun die Proliferationsveränderungen von menschlichen Knochenmarkkulturen nach Applikation von Busulfan in zwei verschiedenen Konzentrationen betrachtet werden, nachdem Gerhartz bereits an Knochenmarkkulturen der Ratte eine Verminderung der Granulopoese und Thrombopoese und eine Vermehrung der Erythroblasten gefunden hat ²¹.

An den Koagulum-Kulturen von humanem Knochenmark übt Busulfan auf die Proliferation der Knochenmarkzellen der Granulopoese eine starke Wirkung aus. Die Verminderung der unreifen Zellen und ihrer Mitosen sowie die Zunahme der reifen unter Busulfan-einfluß könnte einmal durch ein frühzeitiges Absterben der unreifen und ein längeres Überleben der reifen Zellen bedingt sein. Zum anderen vermehren sich die unreifen Zellen weniger, was bei den relativen Zahlen eine Reifungsförderung vortäuschen kann. Im erstgenannten Fall müßte sich in den Zusatzkulturen Karyorrhexis als Zeichen eines gesteigerten Zellunterganges zeigen; in diesen Kulturen wurden jedoch keine abnormen Kernformen festgestellt, so daß eine Reifungsförderung und Verminderung der Regeneration wahrscheinlich sind.

Unter Busulfan sinken die Mitoseindices der Granulopoese nach 24 und 48 Stunden ab. Eine Verminderung des Mitoseindex kann sich ergeben:

1. aus einer Beschleunigung der Mitosedauer
- bei konstanter Generationszeit,
2. aus einer Verlängerung der Generationszeit
- bei konstanter Mitosedauer - entsprechend
einer absoluten Abnahme der Mitosehäufigkeit.

Die erste Möglichkeit muß mit einer relativen Zunahme der Granuloblasten verbunden sein, diese Zellzahl hat sich aber unter Busulfan vermindert, so daß absolut weniger Mitosen vorhanden sein müssen. Die caryologischen Kurven bestätigen dieses Ergebnis: Die Zunahme der frühen und späten Metaphasen sowie die Abnahme der Prophasen zeigen eher eine Verzögerung des Mitoseablaufs. Die Mitosehäufigkeit dürfte also entsprechend der Verringerung des Mitoseindex herabgesetzt sein. Die Zellverdoppelung könnte theoretisch noch unter die Mitosehäufigkeit sinken, wenn man die Möglichkeit von offenen Endomitosen ⁴ einbezieht.

Van Putten und Idsenka ⁴⁶ berichteten 1971, daß Busulfan auf die rasch proliferierende Stammzelle stärker wirkt als auf die ruhende. Wir haben die Mitoseindices jeweils aller Myeloblasten, Promyelocyten und Myelocyten in den Busulfan-Kulturen mit denen der Kontrollkulturen verglichen:

Myeloblasten	Promyelocyten	Myelocyten
a) 2 : 210 = 9,5%	25 : 1680 = 14,8%	46 : 3899 = 11,7%
b) 1 : 220 = 4,5%	26 : 2168 = 11,9%	56 : 5186 = 10,7%

a = Kontrollkulturen

b = Kulturen mit Busulfan-Zusatz

Die Mitoseindices der verschiedenen granulopoetischen Reifestufen zeigen unter Busulfanzusatz eine starke Verminderung der Myeloblasten-Mitosen und einen geringen Einfluß des Busulfan auf die Promyelocyten- und Myelocyten-Mitosen, was mit den Ergebnissen von van Putten und Idsenka übereinstimmt. Wir müssen jedoch darauf hinweisen, daß wir unter Busulfanzusatz zwar auf 220 Myeloblasten = rasch proliferierende Stammzellen nur 1 Mitose (bei der Konzentration von 25 µg/ml) fanden, es sich aber bei der geringen Anzahl der Zellarten in mehr oder weniger normalen Knochenmark-Proben keine Signifikanz ergibt.

Es besteht wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der Reifungsförderung der Zellen und der Verminderung der Mitosen,

so daß mangelnde Teilungsvorgänge zu einer lebhafteren Ausreifung führen. Dies könnte den von Basleer ² gefundenen Ergebnissen entsprechen, der 1965 an Fibroblasten beobachtete, daß Busulfan den Eintritt in die Mitose behindert und sicherlich in der Interphase angreift.

In der Erythropoese wird die Reifungsförderung von den vier Kulturen nur kurzfristig, in zwei Fällen länger festgestellt, wobei besonders die stärkere Beeinflussung bei der sideroachrestischen Anämie auffällt. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß die Reifungsförderung der Granulopoese stärker ausgeprägt ist als die der Erythropoese, was der klinischen Erfahrung mit Busulfan von Galton ¹⁹ und Haddow ²⁵ (1953), nämlich die relativ elektive, depressive Wirkung auf die Granulopoese, entspricht.

Außerdem kann man aus den arithmetischen Mittelwerten der Versuche 2 bis 4 schließen, daß die Wirkung des Busulfan mit der Konzentration von 50µg/ml früher und verstärkt einsetzt als mit 25µg/ml, und somit der von Patrono ⁴⁴ als optimal eruierten Konzentration entspricht.

Zusammenfassung

Menschliches Knochenmark wurde mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen Busulfan - 25µg/ml und 50µg/ml - in vitro behandelt und nach Anlage von Kulturen nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kulturen ausgezählt. Nach Differenzierung der verschiedenen Zellen und Mitosephasen wurden zur Auswertung der Ergebnisse Reifungskurven sowie caryologische Kurven angefertigt, Mitose- und G/E-Indices errechnet und die Signifikanzberechnung durchgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, daß Busulfan die Reifung der Granulopoese signifikant fördert, verbunden mit einer Verminderung der Mitosen. Auf die Erythropoese wird nur eine kurzfristige Reifungsförderung ausgeübt, die in dem Versuch mit dem Knochenmark einer sideroachrestischen Anämie stärker auftritt. Die Mitose- und G/E-Indices sowie die Reifungskurven lassen auf eine frühere und stärkere Wirkung mit der höheren Dosis Busulfan schließen.

Literaturverzeichnis

1. Aust, C. und I. Boll
Veränderungen der Thrombocytenzahlen bei chronischen Myelosen während langjähriger Busulfan - Therapie, aus: Leukämie, Editores R. Gross und J. von de Loo, S. 569 (1972)
2. Basleer, R.
Effet du Myleran sur les protéins nucléaires totales et les acides désoxyribonucléiques de fibroblastes normaux cultivés in vitro.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 159 S. 237 (1965)
3. Belitz, H. J.
Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht 3 S. 83 (1960)
4. Boll, I.
Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1966)
5. Boll, I. und G. Mersch
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17 S. 193 (1968)
6. Bollag, W.
Myleran, ein neues Cytostatikum bei Leukämien.
Schweiz. med. Wschr. 37 S. 872 (1953)
7. Bollag, W.
Cytostatica in der Schwangerschaft.
Schweiz. med. Wschr. 14 S. 393 (1954)
8. Braun, H. und A. Rummel
Schwangerschaft bei Hämoblastosen.
Zbl. Gyn. 87 S. 1713 (1965)
9. Burkl, W. und G. Kellner
Die Hemmung des Follikelwachstums im Rattenovar mit dem Butandioldimethansulfonsäureester.
Z. Zellforsch. 43 S. 97 (1955)

10. Chèvremont, M., E. Baeckeland und J. Frederic
Études cyclophotométrique et histoautoradiographique des
ADN dans des fibroblastes traités par le Myleran.
Biochem. Pharmacol. 4 S. 75 (1960)
11. Damjan Zelenika, K. und B. Stojanovic
The Effect of Myleran on Erythropoiesis in Rats after Ir-
radiation of Hind Legs by Sublethal X Ray Doses.
Jugoslav. Physiol. Pharmacolacta 6/2 S. 343 (1970)
12. Davidson, J. D. und B. B. Freeman
The Effects of Antitumor Drugs upon p³² Incorporation in-
to Nucleic Acids of Mouse Tumors.
Canc. Res. 15 S. 31 (1955)
13. Djaladetti, M.
Prolonged Remission in Chronic Myeloid Leukemia after one
Course of Busulfan.
Blood 27 S. 103 (1966)
14. Dosic, H., D. J. Hurewitz, F. Rosner und J. M. Schwartz
Bullous Eruption and Elevated Leucocyte Alkaline Phos-
phatase in the Course of Busulfan - Treated Chronic Granu-
locytic Leukemia.
Blood 35 S. 543 (1970)
15. Dugdale, M. und A. T. Horst
Busulfan Treatment of Leukemia during Pregnancy.
J. Amer. med. Ass. 199 S. 131 (1967)
16. Elson, L.A.
A Comparison of the Effects of Radiation and Chemicals on
the Blood.
Brit. J. Haemat. 1 S. 104 (1955)
17. Elson, L. A.
Comparative Haematological Effects of Cytostatics and Ra-
diation.
Fünfter Kongress der Europäischen Gesellschaft für Hämato-
logie Freiburg i. Br. 1955 S. 36

18. Fukushima, T. und L. J. Zeldis
Chromosome Aberrations Induced with Busulfan on Human
Lymphocytes.
Acta haemat. jap. 33/3 S. 312 (1970)
19. Galton, D.A.G.
Myleran in Chronic Myeloid Leukemia - Results of Treatment.
Lanc. 1953/I S. 208
20. Gebhardt, E., G. Schwanitz und H. Hartwich
Chromosomenveränderungen bei Mylerantherapie
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin
79 S. 1389 (1973)
21. Gerhartz, H.
Cytostatica und ihre Wirkung auf Haemopoese, Haemoblasto-
sen und Geschwülste.
(Habilitation) S. 86 (1958)
22. Gerhartz, H., H. Frhr. von Kress und E. Praetorius
Über die Prognose der Haemoblastosen.
Internist 3 S. 131 (1962)
23. Glombitza, V. und A. Loeser
Wirkungsänderung von 1,4-Butandiol durch Substitution zu
1,4-Dimethylsulfonylbutan (Myleran)
Klin. Wschr. 1954 S. 809
24. Gollerkeri, M. P. und G. B. Shah
Management of Chronic Myeloid Leukemia - A five Year Sur-
vey with a Comparison of Oral Busulfan and Splenic Irra-
diation.
Cancer 27 S. 596 (1971)
25. Haddow, A.
Myleran in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia -
Discussion on the Chemotherapie of the Reticuloses.
Proc. roy. Soc. Med. 46 S. 692 (1953)
26. Haddow, A. und G. M. Timmis
Bifunctional Sulphonic Acid Esters with Radiomimetic Acti-
vity
Acta Un. int. Cancr. 7 S. 469 (1951)

27. Haddow, A. und G. M. Timmis
Myleran in Chronic Myeloid Leukemia - Chemical Constitution and Biological Action.
Lanc. 1953/I S. 207
28. Hayhoe, F. G. J. und D. A. Kok
Medullary Aplasia in Chronic Myeloid Leukemia during Busulphan Therapy.
Brit. med. J. 1957/II S. 1468
29. Hoover, B. A. und H. R. Schumacher
Acute Leukemia in Pregnancy.
Amer. J. Obstet. Gynec. 96 S. 316 (1966)
30. Hunstein, W., H.-G. Harwerth und S. Raju
Bioptische Untersuchungen zur Frage der therapiebedingten Knochenmarkfibrosen bei der chronisch myeloischen Leukämie.
Med. Klin. 25 S. 991 (1965)
31. Hunstein, W.
Ist Myleran eine leukämogene Substanz?
Schweiz. med. Wschr. 95 S. 1437 (1965)
32. Ionescu, V.
Entwicklung und Prognose der mit Myleran behandelten chronisch myeloischen Leukämie.
Dtsch. med. Wschr. 96 S. 867 (1971)
33. Kenis, Y., P. Dustin jr., J. A. Henry und H. J. Tagnon
Action du Myleran dans 22 cas de leucémie myéloïde chronique.
Fünfter Kongress der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie Freiburg i. Br. 1955 S. 72
34. Killmann, S. A. und E. P. Cronkite
Treatment of Polycythaemia Vera with Myleran.
Amer. J. med. Sci. 241 S. 218 (1961)
35. Knolle, I. und K. H. Meyer
Quantitative Immunglobulinbestimmungen und Antikörperuntersuchungen als Verlaufsbeobachtung bei hämatologischen Erkrankungen unter cytastatischer Therapie.
75. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden 1969 Nr. 122

36. Kyle, R. A., R. S. Schwarz, H. L. Oliner und W. Dameshek
A Syndrome Resembling Adrenal Cortical Insufficiency
Associated with Long Term Busulfan Therapy.
Blood 18 S. 497 (1961)
37. Leake, E., W. G. Smith und H. J. Woodcliff
Diffuse Interstitial Pulmonary Fibrosis after Busulphan
Therapy.
Lanc. 1963/II,1 S. 432
38. Marchal, G. und G. Bilski - Pasquier et Maunand
Les pigmentations cutanées au cours des leucémies
myéloïdes traitées par le Myleran.
Sem. Hôp. Paris 38 S. 3553 (1962)
39. Moeschlin, S.
Langzeitbehandlung der Hämoblastosen.
Dtsch. med. J. 19 S. 551 (1966)
40. Müller - Seifert
Taschenbuch der medizinisch - klinischen Diagnostik,
69. Auflage
J. E. Bergmann Verlag München 1966 S. 560
41. Murphy, M. L., Ada del Moro und C. Lacon
The Comparative Effects of five Polyfunctional Alkylating
Agents on the Rat Fetus, with Additional Notes on the
Chick Embryo.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 68 S. 762 (1957/58)
42. Obrecht, P.
Die Therapie der chronischen Leukämien.
Dtsch. med. J. 19 S. 150 (1968)
43. Oliner, H., R. Schwarz, F. Rubio jr. und W. Dameshek
Interstitial Pulmonary Fibrosis Following Busulphan
Therapy.
Amer. J. Med. 31 S. 134 (1961)
44. Patrono, C., A. Serra, S. Sargentini und A. Ferrara
Studio degli effetti de Busulfan sui linfociti umani in vitro
Progr. med. (Napoli) Vol. 24 S. 931 (1968)

45. Pearson, K.
Documenta Geigy : Wissenschaftliche Tabellen 7. Auflage
S. 169 (1969)
46. van Putten, L. M. und L. K. J. Idsenka
Influence of Cell Kinetics on Sensitivity to Busulfan and
Related Agents.
7th International Congress of Chemotherapy Prague 1971 B5/3
47. Richmond, J. Y. und B. N. Kaufmann
Studies on Busulfan Treated Leukocyte Cultures.
Exp. Cell Res. 54 S. 377 (1969)
48. Roberts, I. I. und G. P. Warwick
Metabolism of Myleran
Nature (Lond.) 183 S. 1509 (1959)
49. Roberts, I. I. und G. P. Warwick
Studie of the Metabolism of Myleran. The Reaction of Myle-
ran with Some Naturally Occuring Thiols in vitro.
Biochem. Pharmacol. 6 S. 205 (1961)
50. Roberts, I. I. und G. P. Warwick
The Mode of Action of Alkylating Agents III.
Biochem. Pharmacol. 6 S. 217 (1961)
51. Scherf, H. R., C. Krüger und C. Karsten
Untersuchungen an Ratten über immunsuppressive Eigenschaf-
ten von Cytostatica unter besonderer Berücksichtigung der
carcinogenen Wirkung
Arzneimittel-Forsch. 20 S. 1467 (1970)
52. Schmährl, D. und H. Osswald
Experimentelle Untersuchungen über carcinogene Wirkungen
von Krebs - Chemotherapeutica und Immunosuppressiva.
Arzneimittel-Forsch. 20 S. 1461 (1970)
53. Schmidt, C. G.
Alkylierende Substanzen
Internist 12 S. 119 (1971)
54. Stacher, A.
Ergebnisse der zytostatischen Therapie maligner Hämoblastosen.
Wien. Z. inn. Med. 47 S. 1 (1966)

55. Storli, E. und A. Pederzini
Alcuni casi di leucosi mieloide acuta e cronica trattati
con 1-4dimetilsulfonossibutano.
Progr. med. (Napoli) 11 S. 390 (1955)
56. Uhl, N., P. Eberle, E. Quellhorst, R. Schmidt und W. Hunster
Myleranbehandlung in der Schwangerschaft
Dtsch. med. Wschr. 39 S. 1856 (1968)

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft
gefördert

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor
Dr. med. Irene Boll für die Überlassung
des Themas und die ständige Beratung und
Unterstützung.

Für die Überprüfung der Signifikanzberech-
nung danke ich auch Herrn Professor
Dr. H. J. Belitz.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1943 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Hans Süßenbach und seiner Ehefrau Cornelia, geb. Hoff, in Rijswijk/Holland geboren.

Von 1950 bis 1954 ging ich in die Volksschulen in Gifhorn und Castrop-Rauxel, anschließend in das staatliche Gymnasium Castrop-Rauxel und nach dem Tode meines Vaters 1957 in das Kalkuhl-Gymnasium Bonn-Oberkassel, an dem ich im Februar 1966 die Reifeprüfung bestand.

1967 begann ich an der FU Berlin das Studium der Medizin und machte hier im April 1968 das Vorphysikum, im April 1970 das Physikum und im Februar 1974 das Staatsexamen der Medizin.

Während meiner Medizinalassistentenzeit habe ich jeweils vier Monate in den Inneren Abteilungen der Universitätskliniken Hamburg-Eppendorf und Berlin-Charlottenburg und vier Monate in der Chirurgie des St. Gertrauden-Krankenhauses Berlin gearbeitet.

Ich bin verheiratet und habe einen 1jährigen Sohn.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198